

欲了解此产品技术细节, 请参阅完整版操作手册#TM337, 获取网址: www.promega.com/tbs

操作步骤

模板 RNA 和逆转录引物混合物配制

1. 在反应管或 PCR 板中加入 RNA 和逆转录引物。配制时, 请保持在冰上操作, 并将盖子盖严。

组分	体积
RNA (最多可加至 5µg)	_µl
引物[Oligo(dT) ₁₅ 引物 和/或 随机引物或 基因特异引物]	1µl
无核酸酶水	_µl
终体积	10µl

2. 可选: RNA 和引物混合物 70°C 变性 5 分钟, 4°C 冷却 5 分钟。
3. 加入 GoScript™ 反应液前, 将 RNA 和引物混合物置于冰上。

GoScript™ 逆转录酶合成 cDNA

4. 冰上配制 GoScript™ 反应液, 各组分添加顺序如下:

组分	GoScript™ 反应液	无逆转录酶 反应液
无核酸酶水	1.5µl	2.5µl
GoScript™ 5X 反应缓冲液	4µl	4µl
25mM MgCl ₂ 溶液	2µl	2µl
10mM PCR 核苷酸混合物	1µl	1µl
重组 Rnasin® 核酸酶抑制剂	0.5µl	0.5µl
GoScript™ 逆转录酶	1µl	0µl
终体积	10µl	10µl

5. 将 GoScript™ 反应液加入到 RNA/引物混合物中 (冰上操作)。

组分	逆转录反应
GoScript™ 反应液或 无逆转录酶反应液	10µl
RNA 和引物混合物	10µl
终体积	20µl

6. 反应条件

步骤	温度	时间
退火 (可选)	25°C	5 分钟
延伸	42°C	1 小时
灭活	70°C	15 分钟

注意: 退火、延伸和灭活条件可以调整, 详情请参考操作手册#TM337。

7. 当天使用, 可将 cDNA 存放于 4°C 或冰上。长期保存可放置 -20°C。

GoTaq® 2-Step RT qPCR System

中文简易操作手册
适用产品货号: A6010



使用 GoTaq®实时定量预混液对 cDNA 定量

- 用水配制 cDNA 稀释品和内参标准品。
- 向 PCR 板对应孔中加入 10µl cDNA 稀释品或 cDNA 未稀释品或内参标准品。阴性对照组加入 10µl 无核酸酶水。盖上盖子并置于冰上。
- 在室温或冰上配制 GoTaq®实时定量 PCR 反应液，组分加入顺序如下。小心混匀，注意不要涡旋。注意避光。

组分	体积
2XGoTaq®实时定量 PCR 预混液	25µl
无核酸酶水	_µl
正向和反向引物 ¹	_µl
终体积	40µl

¹. 引物浓度可以调整，详情参阅#TM337。

注意:

- 参阅#TM337 查看所用扩增仪器是否需要额外添加 CXR 参比染料。
 - 有些仪器，如 BioRad，需额外添加校正染料（如荧光素）。
- 40µl GoTaq®实时定量 PCR 反应液加入到对应样品（如 cDNA 稀释品或内参标准品或无核酸酶水）反应管或 PCR 板孔中，短暂离心使液体富集于管底。

- qPCR 标准扩增程序:

步骤	循环	温度	时间
GoTaq®热启动酶激活	1	95°C	2 分钟
变性	40	95°C	15 秒
退火或延伸		60°C	1 分钟
融解	1	60-95°C	

- 将 PCR 板放于 qPCR 仪上，点击开始按钮启动扩增程序。